



⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 199 38 839 A 1

⑥ Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/48
G 01.N 33/543
C 12 Q 1/68

⑯ Innere Priorität:
199 04 288. 8 03. 02. 1999

⑰ Anmelder:
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 69117 Heidelberg, DE

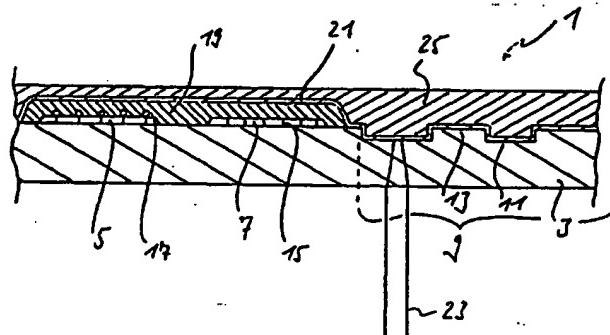
⑲ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑳ Erfinder:
Hörber, Johann Karl Heinrich, Dr., 91744
Weiltingen, DE; Becker, Peter B., Prof. Dr., 80336
München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

④ Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe sowie Meßträger hierfür

⑤ Es wird ein Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe vorgeschlagen, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten analytenspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17) durch optische Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) ermittelt wird. Erfindungsgemäß wird ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3) verwendet, wobei die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet werden. Nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) wird das Substrat (3) auf seiner die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite flächig mit einer Reflexionsschicht (21) versehen. Alternativ ist statt der optischen Auslesung auch eine magnetische Ausleseung des Substrats denkbar.



DE 199 38 839 A 1

DE 199 38 839 A 1

Beschreibung

Die Erfindung befaßt sich mit dem Nachweis von Analyten in einer Meßprobe. Als Analyten kommen beispielsweise Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und deren Derivate sowie Moleküle, die an diesen binden können, in Frage.

Als Meßprobe kommt jede Probe in Frage, von der vermutet wird, daß sie mindestens einen Teil der gesuchten Analyten enthält. Es kann sich dabei z. B. um eine Blutprobe, eine Serumprobe oder/und eine Urinprobe handeln, oder allgemein um jede Lösung, die den gesuchten Analyten enthält.

Zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe ist der Einsatz sogenannter Bindungsassays bekannt. Bei solchen Bindungsassays werden im allgemeinen Analyten durch ihre spezifische Wechselwirkung mit Rezeptoren nachgewiesen. Beispiele für solche Wechselwirkungen sind Protein/Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise während der Genexpression auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effektor-Wechselwirkungen, die im Stoffwechsel auftreten, oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression. Ein systematisches Verständnis dieser molekularen Wechselwirkungen ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis aller biologischen Vorgänge sowohl in normalen als auch in erkrankten Zellen.

Weiterhin können mit Bindungsassays auch Nukleinsäuren nachgewiesen werden. DNA/DNA-Wechselwirkungen spielen eine Hauptrolle in der Molekularbiologie, insbesondere bei der Identifizierung von Genen und bei Strategien zur Kartierung von DNA, beim Nachweis und der Quantifizierung der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose oder Therapie von Erkrankungen. In Frage kommen selbstverständlich auch DNA/RNA- und RNA/RNA-Wechselwirkungen.

Aufgrund der großen Anzahl von Genen, Proteinen, chemischen Effektoren oder RNA-Aptameren erfordert ein Verstehen oder Eingreifen in biochemische Prozesse häufig die Erkennung, Quantifizierung oder Klassifizierung einer Vielzahl von molekularen Wechselwirkungen oder die Identifizierung von wirksamen Wechselwirkungspartnern aus einer großen Anzahl von möglichen Kombinationen. Das Screening und Analysieren einer großen Anzahl von molekularen Wechselwirkungen ist bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren jedoch häufig begrenzt.

Meßproben sollen oftmals auf eine Vielzahl von Analyten hin untersucht werden. Dabei ergibt sich das Problem, daß bei der Auswertung große Datenmengen anfallen. Um in der Praxis erfolgreich zu bestehen, muß die Auswertung jedoch in vertretbarer Zeit möglich sein. Bekannte AnalyseSysteme haben sich hier als nur bedingt zufriedenstellend erwiesen.

Aus einem Artikel "Metal Nano Clusters as Transducers for Bioaffinity Interactions" von Thomas Schalkhammer in Monatshefte für Chemie 000,1–26, Springer-Verlag 1998, Seiten 1–26, ist ein Sensoraufbau für biorekognitive Bindungsvorgänge und katalytisch-enzymatische Prozesse bekannt, bei dem auf einem Polycarbonat-Substrat eine Spiegelschicht aus Silber und darüber eine Abstandsschicht aus einem Polymermaterial angeordnet sind. Die Abstandsschicht dient ihrerseits als Träger für die darauf immobilisierten Binder. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Metall-Clustern, mit denen die nachzuweisenden Analyten markiert werden und die in elektromagnetische Wechselwirkung mit der metallischen Spiegelschicht treten. In Sensorbereichen starker Überdeckung mit gebundenen Metall-Clustern wird Licht, das von der dem Polycarbonat-Substrat abgewandten Seite der Spiegelschicht her eingestrahlt wird, stärker absorbiert als in überdeckungsfreien oder schwächer überdeckten Sensorbereichen, was die optische Auslesung

des Sensors über Absorptionsmessungen ermöglicht.

Für die Funktion dieses bekannten Sensors ist die Dicke der Abstandsschicht ein entscheidender Parameter. Diese muß in einem vorgegebenen Bereich gewählt werden, der von der Wellenlänge des bei der späteren Auswertung eingeschalteten Lichts abhängt. Es muß insbesondere sichergestellt sein, daß die Abstandsschicht auf ihrer gesamten Ausdehnung eine gleichmäßige Dicke besitzt. Hierfür ist ein hoher herstellungstechnischer Aufwand zu betreiben.

In dem angesprochenen Artikel werden für die optische Auswertung dieses Sensors schon Lesegeräte vorgeschlagen, die es erlauben, auch größere Datenmengen zu bewältigen, unter anderem CD-ROM-Lesegeräte.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Weg aufzuzeigen, wie mit geringem Aufwand, nicht nur was die datentechnische Auswertung anbelangt, sondern auch was die Bereitstellung des Sensors anbelangt, eine Meßprobe auf eine große Fülle von Analyten hin untersucht werden kann.

Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung nach einem ersten Aspekt von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf einer seiner Flachseiten analytpezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird.

Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat verwendet wird, daß die Nachweisfelder längs mindestens einer Spirallinie oder/und einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats benachbart angeordnet wird.

Bei der Erfindung können die Nachweisfelder direkt auf dem Substrat ausgebildet werden. Hierbei kann es sich empfehlen, die Substratoberfläche zunächst chemisch vorzubehandeln oder durch Vorbehandlung mit einem Sauerstoffplasma eine Oberflächenmodifizierung zu bewirken. Diese Modifikation kann das Aufbringen der Binder zur Ausbildung der analytpezifischen Nachweisfelder erleichtern. Unterhalb der Binder ist bei der Erfindung demnach keine Abstandsschicht mit einer präzise einzuhaltenden Dicke auf das Substrat aufzubringen, wie dies bei dem von Schalkhammer bekannten Sensor zwingend erforderlich ist. Insfern ergibt sich ein reduzierter fertigungstechnischer Aufwand.

Der Reflektor wird für die optische Auswertung des Assays benötigt. Er kann von einer Reflexionsschicht gebildet werden, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte auf das Substrat über den Nachweisfeldern aufgebracht wird. Aufgrund ihres guten Reflexionsvermögens empfehlen sich metallische Werkstoffe. Grundsätzlich sind auch andere Materialien denkbar, etwa Dielektrika. Bevorzugt wird die Reflexionsschicht aus Aluminium gebildet. Denkbar ist auch Silber als Material für die Reflexionsschicht. Die Reflexionsschicht kann durch chemisches Aufdampfen ausgebildet werden. Möglich ist aber auch, eine vorgefertigte reflektierende Folie auf das Substrat aufzukleben.

Alternativ ist es denkbar, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird, er also nicht direkt auf das Substrat aufgebracht wird. Beispielsweise kann der Reflektor von einer Spiegelplatte gebildet sein, die in einem Auswertegerät angebracht ist, welches zur Auswertung des

Assays verwendet wird.

Die optische Transparenz des Substrats macht es zusammen mit dem auf der substratfernen Seite der Nachweisfelder angeordneten Reflektor möglich, zur optischen Auswertung dieses erfindungsgemäßen molekularbiologischen Sensors auf die Hardware handelsüblicher CD-Lesegeräte zurückzugreifen. Insbesondere bei spiraler Anordnung der Nachweisfelder und bei Ausbildung des Reflektors als direkt auf das Substrat aufgebrachte Reflexionsschicht können solche handelsüblichen CD-Lesegeräte mit vergleichsweise geringem Aufwand so modifiziert werden, daß aus dem rückkehrenden Licht des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls die gewünschten Informationen herausgefiltert werden können. Denkbar ist es, daß hierzu lediglich Software-Modifikationen erforderlich sind. Selbst bei kreisförmiger Anordnung der Nachweisfelder ist die Technik solcher CD-Lesegeräte grundsätzlich anwendbar, sofern die konstruktiven und softwaremäßigen Voraussetzungen für einen Sprung des die Nachweisfelder abtastenden Laserstrahls von Kreislinie zu Kreislinie geschaffen werden.

Besonders eignet sich ein CD-ROM-Lesegerät, das bei Einbettung in eine Computerarchitektur dem Anwender die Möglichkeit gibt, die Auswerte-Software selbst zu definieren.

Die Auswertung der Nachweisfelder kann abhängig vom gewählten Auswertealgorithmus quantitative wie auch qualitative Aussagen liefern. Mittels geeigneter Marker können die optischen Eigenschaften, insbesondere das Absorptionsverhalten, von Nachweisfeldern, in denen sich Analyten an Rezeptoren angeheftet haben, von Nachweisfeldern, an denen Rezeptoren sich keine Analyten angeheftet haben, unterscheidbar gemacht werden. Auf diese Weise ist es beispielsweise über Absorptionsmessungen möglich, diejenigen Nachweisfelder zu erkennen, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte Analyten tragen. Dies wäre zunächst eine rein qualitative Aussage. Will man darüber hinaus auch quantitative Aussagen treffen, so ist es denkbar, die Nachweisfelder mehrmals abzutasten und eine Schwelle, die bei der Auswertung als Entscheidungsgrenze zwischen Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Analyten genommen wird, von Abtastdurchgang zu Abtastdurchgang schrittweise zu verändern. Auf diese Weise können auch Aussagen über die Menge der in den einzelnen Nachweisfeldern hängengebliebenen Analyten getroffen werden.

Wenn der Assay mit einem ggf. geeignet angepaßten CD-ROM-Laufwerk ausgelesen wird, ermöglicht ein angeschlossener Computer dem Anwender die Weiterverarbeitung der von dem Laufwerk gelieferten Datensumme, wobei er das Ergebnis dieser Weiterverarbeitung auf externen Datenspeichern abspeichern kann, beispielsweise um Datenbanken über Patienten zu erstellen. Zur Datenspeicherung können herkömmliche Standardspeicher, etwa Festplatten oder Floppy-Discs, verwendet werden. Mit Computerhilfe ist eine schnelle Auswertung der Datenflut des Laufwerks möglich. Die Kapazität herkömmlicher Computer und Speichersysteme ist in der Regel so ausreichend, daß auch komplexe Genanalysen darauf durchgeführt werden können.

In der Regel wird es erwünscht sein, scharf definierte Nachweisfelder zu erhalten, die zusätzlich sehr klein sein sollen, um eine hinreichende Zahl von Nachweisfeldern auf der Substratscheibe unterzubringen, die zweckmäßigerverweise die Größe einer herkömmlichen CD (Compact Disc) besitzt. Wenn man davon ausgeht, daß der radiale Abstand zweier aufeinanderfolgender Spiralwindungen zweckmäßigerverweise etwa 1,6 µm beträgt, so empfiehlt es sich, die Binder in Feldern aufzubringen, die radial nicht breiter als 1 µm sind, damit zwischen bezogen auf die Scheibenachse radial

benachbarten Nachweisfeldern ein hinreichender Abstand besteht und jedes einzelne Nachweisfeld als solches ortsaufgelöst werden kann. Bevorzugt sind die Nachweisfelder radial sogar schmäler als 1 µm, wobei es zweckmäßig sein

- 5 kann, sie mit einer radialem Breite auszubilden, die im wesentlichen der Breite der bei herkömmlichen CDs eingeprägten Datenvertiefungen (sogenannte Pits) entspricht, nämlich etwa 0,5 µm. Gleichfalls empfiehlt es sich, entlang der Spirallinie bzw. einer Kreislinie einander benachbarte
- 10 Nachweisfelder mit Abstand voneinander anzuordnen, um deren individuelle Auflösung durch das Auswertesystem zu ermöglichen. Die Nachweisfelder können als im wesentlichen quadratische oder kreisförmige Flächen ausgebildet werden. Denkbar ist auch, sie entsprechend der Gestalt der
- 15 Datenpits herkömmlicher CDs in Umfangsrichtung, also in Spiral- bzw. Kreislinienrichtung, länglich auszubilden, etwa oval oder rechteckig.

Um die Binder unter den vorstehend skizzierten dimensionellen Randbedingungen für die Nachweisfelder auf das

- 20 Substrat aufzubringen, eignen sich insbesondere Mikroprinttechniken, Tintenstrahltechniken oder Elektrospraytechniken. Zum Nachlesen, was Mikroprinttechniken anbelangt, wird beispielhaft verwiesen auf: "Microfabrication, Microstructures and Microsystems" von Dong Qin et al., "Topics In Current Chemistry", Band 194, 1998, Seite 6ff., Springer-Verlag. Bezüglich Tintenstrahltechniken wird beispielhaft verwiesen auf: "A new device for multifunctional dosage of liquids by a free jet" von N. Hey et al., Proceedings IEEE-Mems 1998, CH 36176. Elektrospraytechniken, 30 insbesondere Nanoelektrospraytechniken, können beispielsweise in "Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source" von M. Wilm und M. Mann in Analytical Chemistry, Band 68, Nr. 1, 1. Januar 1996, Seiten 1–8, sowie in "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?" von M. Wilm, M. Mann in International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 136 (1994), Seiten 167–180, nachgelesen werden. Diese Techniken ermöglichen es, die Nachweisfelder mit hoher Ortsauflösung gezielt mit vorbestimmten Bindern zu versehen. Die
- 35 Binder können auf die Außenoberfläche der Substratscheibe aufgebracht werden. Denkbar ist es auch, in Analogie zu den Datenpits herkömmlicher CDs kleine Vertiefungen in die Außenoberfläche des Substrats einzubringen und darin die analytischspezifischen Binder zu immobilisieren. Falls solche
- 40 Vertiefungen für die Binder vorgesehen werden, wird es zweckmäßig sein, diese mit einer radialem Breite von etwa 0,5 µm auszubilden, entsprechend der Breite der Datenpits herkömmlicher CDs.

Um biologische Wechselwirkungen auf molekularer 45 Ebene zu untersuchen, kommen als Analyten insbesondere Nukleinsäuren oder/und Proteine in Betracht. So kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, um Protein/Protein-Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise während der Genexpression oder als Zeltsignale auftreten, 50 Enzym/Substrat- oder Enzym/Effekt-Wechselwirkungen während des Stoffwechsels oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression nachzuweisen.

Durch geeignete Wahl der Binder in den Nachweisfeldern 55 können auch DNA/DNA-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, wie es insbesondere zur Genidentifizierung und zur Kartierung von Genen, beim Untersuchen und Quantifizieren der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen von Bedeutung ist.

Molekulare Wechselwirkungen und Enzymaktivitäten können durch die Bindung von RNA-Aptameren oder kleinen chemischen Verbindungen an Makromoleküle beeinflußt werden. Natürliche und synthetische Effektormoleküle

erlauben es deshalb häufig, biochemische Verfahren durch Modulation von oder Eingreifen in makromolekulare Wechselwirkungen zu manipulieren.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Substratmaterial um ein nicht poröses Material. Die Verwendung eines nicht porösen Trägers ermöglicht das definierte Aufbringen auch kleiner Nachweisfelder, so daß eine Miniaturisierung des Testformats bzw. das Aufbringen einer Vielzahl von Nachweisfeldern möglich ist. Geeignete Materialien für das scheibenförmige Substrat sind z. B. Kunststoffe und Glas. Für CD-ROM-Laufwerksapplikationen handelt es sich bevorzugt um ein fokussierendes Material, insbesondere um Polycarbonat.

Die Immobilisierung der Binder an den Nachweisfeldern kann nach an sich bekannten Verfahren durchgeführt werden. Die Immobilisierungsstrategie hängt von der Art des zu immobilisierenden Moleküls und des jeweiligen Substrats ab. Im allgemeinen können Binder direkt an eine Matrix über eine chemische Reaktion gebunden werden, beispielsweise über eine spezielle Aminosäure in einem Protein (insbesondere Cystein oder Lysin) oder über das Phosphatgrundgerüst einer DNA. Die Immobilisierung kann auch mit bifunktionellen chemischen Quervernetzern oder über eine spezifische hochaffine Wechselwirkung, wie etwa die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung durchgeführt werden. Die analytischen Binder können auf der Oberfläche auch adsorbiert werden, wobei eine kovalente Bindung jedoch bevorzugt ist. Als Binder werden auf die Oberfläche des Substrats Substanzen oder/und Moleküle aufgebracht, die in der Lage sind, den gewünschten Analyten spezifisch, insbesondere mit hoher Affinität, zu binden.

Nach Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern wird das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt. Hier können alle dem Fachmann bekannten Methoden herangezogen werden. Ein übliches Verfahren, um molekulare Wechselwirkungen zu analysieren, besteht aus mehreren Schritten: Ein erster Wechselwirkungspartner, z. B. ein analytischer Binder oder Rezeptor, wird mit einem festen Träger kovalent oder adsorptiv verknüpft. Beim Inkontaktbringen der Meßprobe mit den Nachweisfeldern kann ein zweiter Wechselwirkungspartner, z. B. der Analyt, mit dem Rezeptor wechselwirken. Anschließend wird das Vorhandensein des Analyten (oder das Nichtvorhandensein in kompetitiven Testformaten) an der Stelle, an der der Rezeptor immobilisiert ist, nachgewiesen. Die Wechselwirkung zwischen den zwei Bindepartenen wird bevorzugt unter Bedingungen durchgeführt, bei denen beide Reaktanten in einer nativen, aktiven Konfiguration vorliegen, bevorzugt in einer flüssigen Reaktion. Besonders bevorzugt wird das Inkontaktbringen unter einem annähernd physiologischen pH-Wert und bei ionischen Bedingungen durchgeführt.

Der Nachweis erfolgt beim erfundungsgemäßen Verfahren durch Detektion einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder. Die optische Änderung der Nachweisfelder kann z. B. durch Isotope, Enzyme, Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide, Beads oder ähnliches herbeigeführt werden, die als Markersystem dienen. Zum Nachweis wird einer der Wechselwirkungspartner, d. h. der Rezeptor oder der Analyt, direkt oder indirekt markiert. Bevorzugt werden zur Detektion Proteine oder Nukleinsäuren mit einer Biotineinheit derivatisiert, wonach eine Erkennung durch Streptavidinkonjugate möglich ist.

Bevorzugt resultiert das Nachweisverfahren in der Präzipitation eines Farbstoffs oder der Lokalisierung eines Fluorochroms an der Stelle der molekularen Wechselwirkung oder in der Anlagerung von Metall-Clustern mit starker

elektromagnetischer Wechselwirkung. Latex-Beads oder Kunststoff-Beads können ebenfalls angebunden werden. Sie bewirken aufgrund ihres Brechungsverhaltens und ihrer gekrümmten (sphärischen) Oberfläche eine Streuung des einfallenden Ausleselichts, die als Intensitätsminderung detektierbar ist. Bei geeigneter Dimensionierung der Beads können Effekte der destruktiven Interferenz erzielt werden.

Die wechselwirkenden Moleküle, also der Rezeptor und der Analyt, können entweder direkt über ihre spezifischen Bindestellen nachgewiesen werden oder indirekt, indem sie mit einem Marker versehen werden, der eine bekannte spezifische Bindestelle enthält. Beispiele für solche Marker sind Epitope, für die monoklonale Antikörper bekannt sind, oder eine Biotingruppe, die mit Streptavidin bindefähig ist.

- 10 15 Daneben ist auch das direkte spezifische Binden eines Antikörpers an den Analyten möglich. Antikörper und Streptavidin werden bevorzugt mit einem Enzym konjugiert, um eine Auswertung der Nachweisfelder zu ermöglichen. Beispiele für bevorzugte Enzyme sind Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und β -Galaktosidase. Bei Zugabe geeigneter Substrate läuft eine enzymatische chromogene Reaktion ab, wobei gefärbte Produkte entstehen, die an den Orten präzipitieren, an denen die Enzyme gebunden sind und somit das Vorhandensein des Analyten anzeigen. Geeignete Substrate der obigen Enzyme, die eine optische Auswertung ermöglichen, sind für Meerrettichperoxidase beispielsweise Diaminobenzidin (DAB), welches ein in Wasser und Ethanol unlösliches braunes Produkt ergibt, DAB + Metall, welches in Gegenwart von Kobalt oder Nickel ein graues bis schwarzes unlösliches Produkt ergibt, Chlornaphthol, das eine blauschwarze, wasserlösliche Färbung ergibt, Aminoethylcarbazol, das ein rotes, wasserunlösliches Produkt ergibt. Bevorzugte Substrate für alkalische Phosphatase sind Naphthol-AS-BI-Phosphat/New-Fuchsin, was ein rotes, unlösliches Produkt ergibt, Bromchlorindolylphosphat/Nitrotetrazolium, was ein schwarzviolettes Präzipitat ergibt, und für β -Galaktosidase Bromchlorindolyl- β -D-Galaktpyranosit (BCIG), was ein unlösliches blaues Produkt ergibt. Der Nachweis der Analyten kann hier leicht durch optische Detektion des gefärbten Bereichs erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Wechselwirkungsstellen ist die Anfärbetechnik mit Goldkolloiden, wobei auch andere Typen von Metallclustern bzw. -Beads verwendet werden können. Hier sind insbesondere Silberteilchen vorteilhaft, die die Sensitivität eines optischen Nachweissystems aufgrund nichtlinearer optischer Effekte nahe einer Metalloberfläche der Reflexionsschicht erhöhen können. Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung von Farbstoffen als Marker, insbesondere von gefärbten Latexpartikeln. 45 50 Es können auch Glas-Beads aus Siliziumoxid verwendet werden, die mit einem Farbstoff in hoher Konzentration gefüllt sind.

Neben der Messung der Absorption ist bei Wahl geeigneter Marker, beispielsweise fluoreszierender Stoffe, auch eine 55 Messung der Fluoreszenz möglich, wobei hier die Detektionswellenlänge eine andere als die eingestrahlte Wellenlänge ist. Sofern marktgängige CD-Laufwerke, insbesondere CD-ROM-Laufwerke, bei der Auswertung herangezogen werden sollen, können im Fall von Fluoreszenzmessungen konstruktive Laufwerksmodifikationen neben einer entsprechenden Anpassung der Software erforderlich sein. Insbesondere kann es notwendig sein, einen speziell auf die Fluoreszenzwellenlänge abgestimmten Detektor einzubauen.

60 65 Die Erfindung ermöglicht es, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats zusätzliche Informationen einzuschreiben, die zeitgleich mit den Nachweisfeldern ausgelesen und ausgewertet werden können. Demgemäß

wird vorgeschlagen, daß auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder ausgebildet werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezogene oder/und auswertungsbezogene Informationen enthalten. Bei den meßprobenbezogenen Informationen kann es sich beispielsweise um Informationen über Ort und Zeit der Gewinnung der Meßprobe, über die Art der Meßprobe oder über die Person handeln, der die Meßprobe entnommen wurde. Die nachweisfeldbezogenen Informationen können molekularbiologische oder biochemische Angaben über die Nachweisfelder enthalten, insbesondere über den Bindertyp der einzelnen Nachweisfelder. Die auswertungsbezogenen Informationen können Angaben über das zum Nachweis der Analyten angewendete Detektionsprinzip, etwa enzymatische Detektion, Detektion über Farbstoffe, Detektion über Metall-Cluster oder dergleichen, enthalten. Ferner können sie Angaben darüber enthalten, welches physikalische Abtastprinzip ein Lesegerät anwenden soll, etwa eine Absorptionsmessung oder eine Fluoreszenzmessung. Zudem können die auswertungsbezogenen Informationen dem Lesegerät Lage und Ort der Nachweisfelder auf dem Substrat angeben und ihm damit signalisieren, wann das Lesegerät von einer Software zum Lesen der Datenfelder auf eine Software zum Lesen der Nachweisfelder umschalten soll. Insbesondere ist denkbar, daß die auswertungsbezogenen Informationen schon zumindest Teile einer Auswerte-Software enthalten, die vom Lesegerät bei der Auswertung der Nachweisfelder abgearbeitet wird. Auf diese Weise kann der Anwender von mühsamen Programmierungsaufgaben zur Softwareanpassung seines Computerarbeitsplatzes entlastet werden. Die vollständige Auswerte-Software kann bereits herstellerseitig, soweit geeignete Software-Standards existieren, in den Sensor eingeschrieben werden.

Grundsätzlich ist es denkbar, die Nachweisfelder und die Datenfelder längs der Spirallinie getrennt anzutragen. Es kann aber zweckmäßig sein, Nachweisfelder und Datenfelder abwechselnd entlang der Spirallinie anzutragen, beispielsweise in der Weise, daß einem einzelnen Nachweisfeld oder einer Gruppe von Nachweisfeldern ein Datenfeld zugeordnet wird, das dem Nachweisfeld bzw. der Gruppe von Nachweisfeldern längs der Spirallinie vorhergeht und dem Auswertesystem Informationen über dieses Nachweisfeld bzw. diese Gruppe von Nachweisfeldern liefert.

Sofern die Nachweisfelder längs konzentrischer Kreislinien angeordnet werden, können Nachweisfelder und Datenfelder ebenfalls abwechselnd entlang mindestens einer Kreislinie angeordnet werden. Denkbar ist aber auch, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.

Die Datenfelder sollen zweckmäßigerweise von der gleichen Seite der Substratscheibe her ausgelesen werden können wie die Nachweisfelder. Dabei besteht eine Möglichkeit darin, zur Bildung der Datenfelder Vertiefungen in die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats einzubringen, wobei der Reflektor so angebracht wird, daß er in die Vertiefung hineinreicht. Zweckmäßigerweise erfolgen die Codierung der Daten und die Anordnung der Vertiefungen nach Maßgabe eines gängigen CD-Formats, insbesondere des CD-ROM-Formats, so daß die Datenfelder mittels herkömmlicher CD-Laufwerke ohne Softwaremodifikationen gelesen werden können.

Es ist sogar denkbar, zur Bildung der Datenfelder auf Vertiefungen zu verzichten. Durch Anbindung von optisch absorbierenden oder streuenden Substanzen an das Substrat kann ebenfalls Einfluß auf die Reflexion des zur Auslesung auf die Nachweis- und Datenfelder gerichteten Lichtstrahls

genommen werden. So ist es denkbar, bei geeigneter Wahl von Metall- oder Kunststoff-Beads ähnliche Effekte destruktiver Interferenz zu erzielen, wie sie auch durch Vertiefungen in der Substratoberfläche erreicht werden. Es kann daher vorgesehen sein, daß zur Bildung der Datenfelder eine einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

Weil bei Ausbildung des Reflektors als auf das Substrat aufgebrachte Reflexionsschicht die letztere erst nach Abschluß sämtlicher molekularbiologischer oder biochemischer Analyseschritte aufgebracht wird, sind Vorher-Nachher-Messungen der Nachweisfelder nicht möglich, also Messungen vor und nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern. Um dennoch aus den Meßsignalen verlässliche Aussagen darüber zu gewinnen, ob und welche Nachweisfelder mit Analyten besetzt sind, kann es vorteilhaft sein, auf der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats entlang der Spirallinie bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenzfeld auszubilden, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei der Auswertung der Nachweisfelder verwendet werden. Beispielsweise können diese Referenzfelder einen bekannten, für analytfreie Nachweisfelder typischen Referenzabsorptionsgrad für das Licht des abtastenden Lichtstrahls besitzen, der von einem Absorptionsgrad unterscheidbar ist, den analytbehaftete Nachweisfelder typischerweise besitzen. Daneben können auch Referenzfelder ausgebildet sein, die den Analyten oder/und Marker enthalten und die bei korrekter Durchführung des Verfahrens als positive Kontrolle dienen. Die Referenzfelder können zudem zur Kalibrierung und zur Quantifizierung der Messungen herangezogen werden.

Im Bereich der Nachweisfelder kann sich eine vermindernde Haftung der Reflexionsschicht einstellen, wenn diese unmittelbar auf die darunterliegende molekularbiologische oder biochemische Ebene aufgebracht wird. In diesem Fall kann es günstig sein, nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern zunächst eine Deckschicht aus einem optisch transparenten Material auf die Nachweisfelder aufzubringen, bevor die Reflexionsschicht aufgebracht wird. Die Deckschicht kann auch zur Fixierung der Reagenzien in den Nachweisfeldern dienen. Das Material und die Dicke der Deckschicht wird man so aufeinander abstimmen, daß eine Beeinflussung der optischen Eigenschaften des Sensors durch die Deckschicht, etwa durch Fokussierungs- oder Absorptionseffekte, nicht oder zumindest in beherrschbarer Weise erfolgt. Ein Material auf Polymerbasis hat sich für die Deckschicht als geeignet gezeigt. Sie kann z. B. als Folie oder mittels eines Sprühverfahrens aufgebracht werden. Sofern der Sensor auch Vertiefungen in Datenfeldern aufweist, wird man sicherstellen müssen, daß die Vertiefungen nicht durch das Material der Deckschicht wieder aufgefüllt werden, um einen Verlust der durch die Vertiefungen repräsentierten Dateninformationen zu vermeiden. Sprühverfahren sind zur lokalen Aufbringung der Deckschicht denkbar. Vorstellbar ist es auch, die Oberfläche der Substratscheibe gedanklich in Segmente, etwa Kreissektoren, aufzuteilen, von denen ein Teil ausschließlich für Nachweisfelder und ein anderer Teil ausschließlich für Datenfelder reserviert wird. Die Segmente mit Datenfeldern können dann sehr leicht von der Deckschicht freigehalten werden.

Das Substrat mit den darauf immobilisierten Bindern kann als handelbare Einheit verpackt und an Anwender verschickt werden. Denkbar ist es, daß der Hersteller einen kundenspezifischen Satz von Bindern zusammenstellt und auf das Substrat aufträgt. Vorstellbar ist auch, kundenun-spezifisch, aber applikationsspezifisch, beispielsweise für

bestimmte Genanalysen, einen Satz von Bindern auf ein Substrat aufzubringen und dieses als vorbereiteten Meßträger anzubieten. Es empfiehlt sich, diesen Meßträger zu trocknen, bevor er verpackt und verschickt wird. Die zu untersuchende Meßprobe wird dann vom Anwender, also vom Käufer des Meßträgers, aufgebracht. Gleiches kann auch für markerenthaltende Reagenzien gelten. Die Aufbringung der Reflexionsschicht und ggf. der Deckschicht nach Abschluß des molekularbiologischen bzw. biochemischen Nachweisverfahrens, das auch Waschschritte umfassen kann, kann beim Anwender erfolgen, sofern diesem hierfür geeignete Geräte zur Verfügung stehen. Denkbar ist auch, daß der Anwender den analytbehafeten Meßträger zum Hersteller oder zu einem anderen Labor zurücksendet, wo diese Schichten aufgebracht werden.

Auf der Reflexionsschicht kann noch eine Schutzschicht flächig aufgebracht werden, wobei sich wegen seiner Schlag- und Kratzfestigkeit ein Material auf Acrylbasis eignet. Der so geschützte Meßträger kann über lange Zeiträume hinweg aufbewahrt werden und jederzeit wieder ausgelesen werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Meßträger zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, der sich insbesondere zur Durchführung des vorstehend erläuterten Verfahrens eignet.

Nach einem anderen Aspekt geht die Erfindung zur Lösung der eingangs gestellten Aufgabe von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf mindestens einer seiner Flachseiten analytische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, so daß die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird. Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und daß die Nachweisfelder längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie verteilt auf dem Substrat angeordnet werden.

Die kreis- oder spiralförmige Verteilung der Nachweisfelder auf dem Substrat ermöglicht die Verwendung marktgängiger Magnetplatten-Lesegeräte, sogenannter Hard-Disc-Laufwerke. Gegebenenfalls wird eine softwaremäßige Adoption der Laufwerkssteuerung notwendig sein. Die magnetische Auslesung der Nachweisfelder ermöglicht es sogar, auf beiden Flachseiten des Substrats Nachweisfelder auszubilden, so daß sich die Packungsdichte der Sensoren mit Nachweisfeldern weiter erhöhen läßt. Hinsichtlich der gegenseitigen Abstände, der Größe und der Anordnung der Nachweisfelder sowie etwaiger Daten- und Referenzfelder auf dem Substrat treffen im wesentlichen die Angaben zu, die zuvor für den optisch auslesbaren Sensor gemacht wurden.

Um zu verhindern, daß die Marker durch Kontakt mit einem Lesekopf des Auswertegeräts vom Substrat weggerissen werden, kann nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder aufgebracht werden. Diese wird man zweckmäßig flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufbringen. Für die Fixierschicht hat sich ein Material auf Polymerbasis als geeignet erwiesen.

Darüber hinaus kann vor der Ausbildung der Nachweisfelder oder nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine magnetische oder/und magnetisierbare Partikel enthaltende Magnetschicht flächig auf jede

Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht werden. Die Magnetschicht ermöglicht es, zusätzlich Daten in den Sensor einzuschreiben, die zusammen mit den Nachweisfeldern ausgelesen werden können. Die magnetischen Eigenschaften der Magnetschicht wird man so wählen, daß die durch die Marker hervorgerufenen lokalen Schwankungen der magnetischen Feldstärke oder der magnetischen Flußdichte nicht infolge der Magnetschicht "verschwimmen" und undetektierbar werden. Zwar ist es grundsätzlich denkbar, daß die Magnetschicht unterhalb der molekularbiologischen oder biochemischen Schicht des Sensors unmittelbar auf das Substrat aufgebracht wird. Zweckmäßig ist es jedoch, sie erst nach Abschluß der molekularbiologischen oder biochemischen Verfahrensschritte aufzubringen, da sie so zugleich als Fixierschicht dienen kann.

Die Erfindung betrifft ferner ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach dem vorstehend beschriebenen ersten oder zweiten Aspekt. Das Testkit umfaßt dabei einen mit immobilisierten Bindern vorbereiteten Meßträger, Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens, insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare Nachweisreagenzien, sowie ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen. Der Meßträger liegt bevorzugt in getrockneter Form vor.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines Meßträgers der vorstehend beschriebenen Art in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungssassay oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäure-Assay.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es stellen dar:

Fig. 1 eine schematische Schnittdarstellung eines erfindungsgemäßen molekularbiologischen oder biochemischen Sensors ("Biosensor") mit Nachweis- und Datenfeldern und

Fig. 2 schematisch die Verteilung der Nachweis- und Datenfelder auf dem Biosensor.

In Fig. 1, die die realen Größenverhältnisse nicht getreu wiedergibt, ist der Biosensor allgemein mit 1 bezeichnet. Er besitzt die Form einer Kreisscheibe. Seine Größe entspricht zweckmäßigerweise der einer herkömmlichen Compact Disc, deren Durchmesser üblicherweise etwa 12 cm beträgt. Der Biosensor 1 umfaßt ein Trägersubstrat 3, das aus einem optisch transparenten Material, vorzugsweise Polycarbonat, gefertigt ist. Auf der in Fig. 1 oberen Flachseite des Substrats 3 sind Nachweisfelder 5, 7 sowie Datenfelder 9 ausgebildet. In den Datenfeldern 9 sind Informationen über die Meßprobe oder/und über die Nachweisfelder oder/und über die Auswertung niedergelegt. Wie bei herkömmlichen CDs sind die Informationen in den Datenfeldern 9 durch abwechselnde vertiefte Bereiche 11 und nicht vertiefte Bereiche 13 des Substrats 3 repräsentiert.

In den Nachweisfeldern 5, 7 sind analytische Binder bzw. Rezeptoren immobilisiert. Diese Binder sind in Fig. 1 schematisch durch kurze Striche 15 symbolisiert. Jedes Nachweisfeld 5, 7 trägt eine Vielzahl von Bindern 15 gleichen oder unterschiedlichen Typs. Das Nachweisfeld 7 repräsentiert in Fig. 1 ein Nachweisfeld, an dem nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern 5, 7 keine Analyten haften geblieben sind. Dagegen repräsentiert das Nachweisfeld 5 ein Nachweisfeld, an dem Analyten haften geblieben sind. Diese Analyten sind in Fig. 1 schematisch durch kleine Kreise 17 dargestellt, die zugleich die Marker symbolisieren, anhand deren die optische Detektion des Vorhandenseins der Analyten möglich ist.

Die Nachweisfelder 5, 7 sind in eine Deckschicht 19 eingebettet, die nur in den die Nachweisfelder 5, 7 tragenden Bereichen des Substrats 3 aufgebracht ist, nicht jedoch in den die Datenfelder 9 tragenden Bereichen des Substrats 3. Die Deckschicht 19 besteht ebenfalls aus einem optisch

transparenten Material, vorzugsweise einem Polymermaterial. Sie fixiert die Marker auf dem Substrat 3 und dient zugleich als Haftvermittler zwischen dem Substrat 3 und einer Reflexionsschicht 21, die flächig auf das Substrat 3 aufgebracht ist, über sämtliche Nachweisfelder 5, 7 und sämtliche Datenfelder 9 hinwegreicht und in die Vertiefungen 11 der Datenfelder 9 hineinreicht. Die Reflexionsschicht 21 besteht vorzugsweise aus Aluminium, kann aber beispielsweise auch aus Silber bestehen und wird zweckmäßigerweise durch chemisches Aufdampfen erzeugt. Die Reflexionsschicht 21 dient als Reflektor für das Licht eines Laserstrahls 23, der von der Unterseite des Substrats 3 her zur Auslesung der Nachweisfelder 5, 7 und der Datenfelder 9 auf den Biosensor 1 gerichtet wird. Das reflektierte Licht wird mittels gängiger Methoden ausgewertet. Beispielsweise wird es mittels eines Polarisationsfilters von dem eingestrahlten Licht getrennt und sodann auf seine Intensität hin ausgewertet. Das Material des Substrats 3 hat vorteilhaft einen solchen Brechungsindex, daß der Laserstrahl 23 auf seinem Hinweg im Substrat 3 fokussiert wird, so daß der letztlich auf die Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 einfallende Lichtfleck sehr klein gehalten werden kann.

Zur Oberseite hin ist der Biosensor 1 durch eine flächig aufgebrachte Deckschicht 25 abgeschlossen, die den Biosensor 1 vor schädlichen, chemischen oder mechanischen Einflüssen schützt. Vorzugsweise besteht sie aus einem Acrylmaterial.

Die Nachweisfelder 5, 7 und die Datenfelder 9 sind in abwechselnder Reihenfolge längs einer Spirallinie auf dem Substrat 3 angeordnet. Fig. 2 zeigt einen Ausschnitt zweier aufeinanderfolgender Windungen der Spirallinie. Letztere ist in Fig. 2 als gestrichelte Linie dargestellt und mit 27 bezeichnet. Mit d ist ferner der radiale Abstand zwischen den beiden Windungen, also die Spiralsteigung, bezeichnet. Er beträgt beispielsweise etwa 1,6 µm. Die Vertiefungen 11, die bei Anwendung der für CDs, insbesondere CD-ROMs, gängigen Codierung abgestuft variable Umfangslänge besitzen können, sind beispielsweise etwa 0,5 µm in radialer Richtung breit. Um radiale Überlappungen mit den Nachweis- oder Datenfeldern benachbarter Spiralwindungen zu vermeiden, sind die Nachweisfelder 5, 7 ebenfalls radial so schmal ausgebildet, daß ein hinreichender Abstand zu den Feldern der benachbarten Spiralwindungen besteht. Insbesondere können die Nachweisfelder 5, 7 gleichfalls etwa 0,5 µm breit sein. Bei derartiger Bemessung kann ohne weiteres auch das "Ausfransen" in Kauf genommen werden, das bei enzymatischem Nachweis der in den Nachweisfeldern 5 anhaftenden Analyten häufig zu beobachten ist. In Umfangsrichtung können die Nachweisfelder 5, 7 länglich sein, so daß sie mit einer hinreichend großen Gesamtfläche ausgebildet werden können. Auch in Umfangsrichtung werden die Nachweisfelder 5, 7 hinreichenden Abstand voneinander und von den Datenfeldern 9 aufweisen.

Die vorstehenden Maßangaben empfehlen sich insbesondere, wenn zur Auslesung der Daten- und Nachweisfelder CD-Laufwerke mit einem Fleckdurchmesser des Laserstrahls 23 von etwa 2 µm verwendet werden.

Nachfolgend werden noch einige molekularbiologische oder biochemische Anwendungsbeispiele der Erfahrung erläutert.

Beispiel 1

Anwendungen

Die Anwendungen können gemäß der Natur des immobilisierten Bindepartners (A), des analytischen Binders, und der Natur seines "Liganden", d. h. des Analyten (B),

klassifiziert werden. Als Wechselwirkungspartner werden bevorzugt Nukleinsäuren und/oder Proteine verwendet, es können jedoch auch andere Partner von spezifischen Bindepaaaren, wie etwa Lektine oder Zucker eingesetzt werden.

- 5 Bevorzugt werden die Rezeptoren bzw. Analyte, insbesondere Proteine und Nukleinsäuren, mit einer Biotingruppe derivatisiert, wobei die Biotingruppe dann vorteilhaft mit einem Streptavidin-Enzymconjugat, wie etwa Meerrettichperoxidase, nachgewiesen wird. Das Substrat der Enzymreaktion wird derart ausgewählt, daß sich an der Stelle der molekularen Wechselwirkung ein intensives, dunkles Präzipitat bildet, das den Detektionslaser quenzt. Daneben kann der Nachweis auch durch direkte Derivatisierung eines Wechselwirkungspartners mit einem Fluorochrom in Kombination mit einem geeigneten Laser erfolgen.

Beispiel 1.1

Der Rezeptor (A) ist ein RNA-Aptamer, ein Peptid oder ein natürliches oder synthetisches Effektorprotein und der Analyt (B) ist ein Protein.

- 20 Die Eigenschaften eines Enzyms oder Regulationsfaktors bei der Genexpression werden häufig durch die Assoziation kleiner Effektor- oder Ligandmoleküle moduliert. Ein Beispiel sind Hormonrezeptoren, die nach Bindung an das Hormon in eine aktive Konformation überführt werden. Die Proteinfunktion kann durch Wechselwirkung eines Substratanalogons oder durch allosterische Effektoren moduliert werden. Um geeignete kleine Chemikalien zu identifizieren,
- 25 30 40 45

werden Screening-Verfahren für Liganden durchgeführt, wobei eine große Anzahl an verschiedenen Chemikalien untersucht wird.

Mit dem erfundengemäßen Verfahren ist es möglich, chemische Bibliotheken durchzutesten. Dabei wird eine Vielzahl von verschiedenen kleinen Chemikalien in einer definierten Ordnung auf dem Meßträger immobilisiert, wobei das fragliche Protein unter verschiedenen Stringentbedingungen damit in Kontakt gebracht wird. Gebundenes Protein wird, wenn es mit einem geeigneten Fluorochrom, beispielsweise einem Latexpartikel, markiert ist, direkt nachgewiesen oder indirekt unter Verwendung einer Enzymamplifikationskaskade. In entsprechender Weise können große Bibliotheken von RNA-Aptamern oder Peptiden gescreent werden, entweder isoliert oder in ein Fusionsprotein eingebunden, hinsichtlich Wechselwirkungen mit einem in Frage stehenden Protein.

Beispiel 1.2

50 Der Rezeptor (A) ist ein Protein und der Analyt (B) ist eine Nukleinsäure oder ein Ligant.

- 55 Proteinbibliotheken können hinsichtlich bestimmter Bindeeigenschaften, z. B. der Wechselwirkung mit einer definierten DNA-Sequenz gescreent werden. Vervielfältigte Meßträger, die definierte Bereiche von Proteinen enthalten, die zusammen die Produkte einer cDNA-Expressionsbibliothek darstellen, können mit spezifischen Liganden oder DNA-Bindestellen charakterisiert werden. Die angeordneten Proteine können so, wie sie in der Bibliothek sind, unbekannt sein und erst durch das erfundengemäße Verfahren zugeordnet werden. Alternativ können Bereiche von bekannten Proteinen oder Derivate eines definierten Proteins, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese, untersucht werden.
- 60 65

Beispiel 1.3

Der Rezeptor (A) ist eine DNA oder RNA und der Analyt

(B) ist ein Protein.

Eine große Anzahl von verschiedenen doppelsträngigen DNA-Fragmenten kann auf den Nachweifeldern aufgebracht werden. Dabei kann es sich entweder um kleine Fragmente, beispielsweise um Oligonukleotide oder um größere DNA-Fragmente bis zu sehr großen DNA-Abschnitten handeln, die eine geordnete Bibliothek von genomischen DNA-Fragmenten darstellen. Die Anwendungen umfassen die systematische Suche nach möglichen genomischen Bindestellen für DNA-Bindepoteine, aber auch andere DNA-Bindemoleküle können nachgewiesen werden, wie etwa Interkalatoren, kleine Moleküle mit Bevorzugung bestimmter Sequenzen, PNAs und Sequenzen, die eine Trippelhelix bilden. Ebenso können als Rezeptormoleküle in den Nachweifeldern RNA-Moleküle aufgebracht werden, wie etwa die Transskripte einer cDNA-Bibliothek oder die Derivate einer definierten RNA, wie etwa das Produkt einer zufälligen Mutagenese.

Beispiel 2

Nukleinsäureuntersuchungen

Der Rezeptor (A) ist eine einzelsträngige DNA und der Analyt (B) ist eine einzelsträngige DNA oder RNA.

Beispiel 2.1

DNA-Kartierung

Es ist inzwischen möglich, ganze Genome zu sequenzieren und die Genome von höheren Eukaryonten, wie etwa Menschen, Mäusen und Fliegen, werden kartiert und durch geordnete Klone (wie etwa P1-Phagenklone) abgedeckt, wobei davon ausgegangen wird, daß die Sequenzen aller Genome in absehbarer Zeit erhältlich sind. Hier können erfundsgemäße Meßträger hergestellt werden, die ganze Genome in geordneten Arrays oder Bereichen enthalten. Damit ist es möglich, ein kloniertes Stück DNA in einem einzigen Hybridisierungsschritt seiner genomischen Lokalisierung zuzuordnen und abhängig von der Auflösung des Arrays (welche eine Funktion der mittleren Sequenzlänge und der Zahl an einzelnen DNA-Molekülen ist) sogar das Gen selbst zu identifizieren. Ein Beispiel einer solchen Anwendung sind die P1-Arrays von Genome Systems, welche bisher schlecht zu screenen sind, da sie nur auf Membranen erhältlich sind. Ein Aufbringen dieser P1-Arrays auf den erfundsgemäßen Meßträgern ermöglicht eine einfache und unkomplizierte Anwendung. Translokationen und andere genomische Umordnungen, die häufig Ursache genetischer Erkrankungen sind, können ebenfalls auf einfache Weise kartiert werden, einschließlich Deletionen des mitochondrialen Genoms. Darüber hinaus können Insertionen von Transgenen leicht kartiert werden, wenn die insertierte DNA zusammen mit einer kleinen Menge an flankierender genomischer DNA nachgewiesen wird.

Beispiel 2.2

Genidentifizierung und/oder Genklonen

Arrays oder Bereiche von diagnostischen Oligonukleotiden, die alle bekannten Gene einer gegebenen Spezies darstellen, ermöglichen die direkte Identifizierung eines in Frage stehenden Gens. Hierzu können z. B. cDNA-Arrays von KlonTech oder die DNA-Chips von Affymetrix, auf denen alle Hefegene aufgetragen sind, durch Übertragung auf die erfundsgemäßen Meßträger verbessert werden.

Beispiel 2.3

Expressions-Profiluntersuchungen

- 5 Durch Aufbringen von DNA auf erfundsgemäße Meßträger, die alle Gene eines Organismus zeigen, kann das Expressionsprofil untersucht werden. Auf dem Meßträger wird ein komplexes Gemisch von RNA aufgebracht, die den Expressionszustand einer bestimmten Zelle darstellen oder
 10 eine davon abgeleitete cDNA-Population. Der auf dem Meßträger festgestellte Expressionszustand kann leicht mit dem Expressionszustand anderer Zellen verglichen werden, die von anderen Gewebe stammen, andere Entwicklungsstadien oder andere Stoffwechselstadien darstellen. Alternativ können DNA-Proben untersucht werden, die bestimmte ausgewählte DNA-Zustände darstellen, wie etwa Zellzyklusgene, Signalübermittlerkomponenten usw. Da die erfundsgemäßen Meßträger über lange Zeit gelagert werden können, können Expressionsprofile erstellt werden, die archiviert und zu Vergleichszwecken herangezogen werden können.

Beispiel 2.4

Molekulare Diagnose von DNA-Polymorphismen

- Das erfundsgemäße Verfahren kann zur Diagnose von üblichen und seltenen DNA-Polymorphismen verwendet werden, einschließlich der Kartierung von Mutationen in
 30 Proto-Onkogenen, die übliche Tumore hervorrufen. Ein geeigneter Meßträger enthält überlagernde Oligonukleotide, die zusammen ein gesamtes Gen (z. B. die Wildtypsequenz) umfassen, zusammen mit Oligonukleotiden, die alle möglichen oder häufig auftretende Mutationen dieser Sequenz enthalten. Das entsprechende DNA-Fragment wird von Patienten durch PCR isoliert und an den relevanten Gen-Meßträger unter Bedingungen hybridisiert, unter denen die Hybridisierung nur bei einer perfekten Sequenzübereinstimmung stattfindet. Ein Vergleich der Hybridisierung der experimentellen DNA an Wildtyp- bzw. Mutantoligonukleotide ermöglicht es, exakt festzustellen, welche Art von Mutation in einer Sequenz auftritt.

Beispiel 3

- Neben den oben beschriebenen Anwendungen, bei denen ein einfacher Bindevorgang nachgewiesen wird, der Signale ergibt, die ggf. durch eine Enzymkaskade verstärkt werden können, um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen, kann das erfundsgemäße Verfahren auch in Anwendungen verwendet werden, die umfangreichere Behandlungen des Meßträgers erfordern, wie etwa eine PCR-Amplifizierung, die analog zu in situ PCR-Amplifikationen durchgeführt wird. Auf diese Weise können auch infizierende Mittel nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten analytische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweifeldern (5, 7) immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweifeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17) durch optische Auswertung der Nachweifelder (5, 7) ermittelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein aus einem optisch

transparenten Material gefertigtes Substrat (3) verwendet wird, daß die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) ein optischer Reflektor (21) der die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) benachbart angeordnet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Reflektor von einer Reflexionsschicht (21) gebildet wird, welche auf das Substrat (3) über den Nachweisfeldern (5, 7) aufgebracht wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reflexionsschicht (21) aus Aluminium gebildet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß bezogen auf die Scheibenachse radial benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit radialem Abstand voneinander angeordnet werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß entlang der Spirallinie (27) bzw. einer Kreislinie einander benachbarte Nachweisfelder (5, 7) mit Abstand voneinander angeordnet werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich Datenfelder (9) ausgebildet werden, welche meßprobenbezogene oder/und nachweisfeldbezogene oder/und auswertungsbezogene Informationen enthalten.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder (5, 7) und Datenfelder (9) abwechselnd entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer Kreislinie angeordnet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Nachweisfelder und Datenfelder jeweils auf gesonderten Kreislinien ausgebildet werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder (9) Vertiefungen (11) in die die Nachweisfelder (5, 7) tragende Flachseite des Substrats (3) eingebracht werden und daß der Reflektor (21) so angebracht wird, daß er in die Vertiefungen (11) hineinreicht.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung der Datenfelder eine einfallendes Leselicht beeinflussende Substanz auf die die Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß auf der die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite des Substrats (3) entlang der Spirallinie (27) bzw. mindestens einer Kreislinie zusätzlich mindestens ein Referenzfeld ausgebildet wird, dessen optische Eigenschaften als Referenz bei der Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7), unterhalb des Reflektors eine Deckschicht (19) aus einem optisch transparenten Material auf die Nachweisfelder (5, 7) aufgebracht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß für die Deckschicht (19) ein Material auf Polymerbasis verwendet wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein Substrat (3) aus Polycarbonat verwendet wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (3) an einem Herstellungsort mit den Bindern (15) versehen, getrocknet und verpackt wird und daß das so präparierte Substrat (3) sodann zu einem von dem Herstellungsort entfernten Anwendungsort gebracht wird, an dem die Meßprobe von einem Anwender in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Analyten durch eine Detektion einer Änderung der optischen Eigenschaften der Nachweisfelder erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die optische Änderung der Nachweisfelder durch Isotope, Enzyme, Fluorochrome, Farbstoffe, Metallkolloide oder/und Beads herbeigeführt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß Latex-Beads, Kunststoff-Beads, Glas-Beads oder/und Metall-Beads verwendet werden.

20. Meßträger zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 19, gekennzeichnet durch ein scheibenförmiges, aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3), auf dem auf einer seiner Flachseiten analytsspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert sind, wobei die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) oder/und einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet sind.

21. Meßträger nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über den Nachweisfeldern (5, 7) eine nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) flächig auf das Substrat (3) aufgebrachte Reflexionsschicht (21) angeordnet ist.

22. Meßträger nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Reflexionsschicht (21) eine Schutzschicht (25) flächig aufgebracht ist.

23. Meßträger nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzschicht (25) aus einem Material auf Acrylbasis gefertigt ist.

24. Meßträger nach Anspruch 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er als Handelseinheit verpackt ist.

25. Meßträger nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß er getrocknet verpackt ist.

26. Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf mindestens einer seiner Flachseiten analytsspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisfelder magnetisch ausgewertet werden und hierzu Binder oder die nachzuweisenden Analyten mit magnetischen oder/und magnetisierbaren Markern markiert werden und daß die Nachweisfelder längs einer Vielzahl konzentrischer Kreislinien oder/und längs mindestens einer Spirallinie verteilt auf dem Substrat angeordnet werden, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren Merkmalen mindestens einer der

Ansprüche 1 bis 25.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine Fixierschicht auf die Nachweisfelder aufgebracht wird. 5

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Fixierschicht flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß für die Fixierschicht ein Material auf Polymerbasis verwendet wird. 10

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Ausbildung der Nachweisfelder oder nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern eine magnetische oder/ und magnetisierbare Partikel enthaltende Magnetschicht flächig auf jede Nachweisfelder tragende Flachseite des Substrats aufgebracht wird. 15

31. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 19 und 26 bis 30, umfassend

- a) einen mit immobilisierten Bindern (15) vorbereiteten Meßträger (3),
- b) Reagenzien zur Durchführung des Nachweisverfahrens, insbesondere optisch oder/und magnetisch detektierbare Nachweisreagenzien, und
- c) ggf. Wasch- oder/und Pufferlösungen. 25

32. Testkit nach Anpruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßträger (3) in getrockneter Form vorliegt.

33. Verwendung eines Meßträgers nach einem der Ansprüche 20 bis 25 in einem Immunoassay oder/und Nukleinsäurehybridisierungsassay oder/und Lektin-Zucker-Assay oder/und Protein-Nukleinsäureassay. 30

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 1

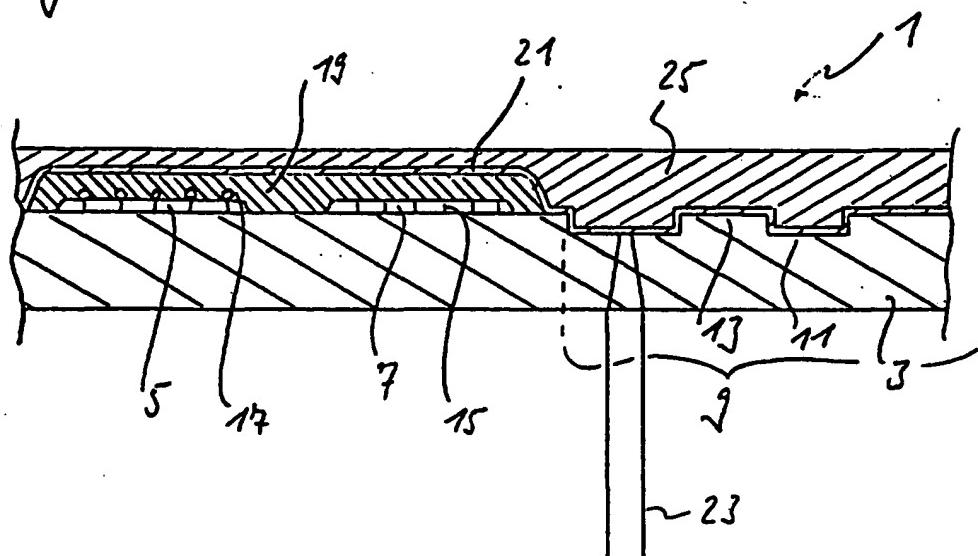


Fig. 2

